

FEHÉRJETARTALOM MEGHATÁROZÁSA NESSLER-REAGENSSEL KIFEJLESZTETT SZÍN FOTOMETRIÁS KIÉRTÉKELÉSÉVEL HÚSIPARI TERMÉKBEN

POLÁK ARANKA*

Az élelmiszeriparban táplálkozásélettani és kereskedelmi szempontból nagy jelentőségű a fehérjetartalom vizsgálata, ellenőrzése.

A fehérjék a szervezet építői, energiaadói, nagy az élettani szerepük. A táplálkozásban a magas biológiai értékű fehérjék a legértékesebbek [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

A laboratóriumokban általános problémát jelent a fehérje gyors, egyszerű mennyiségi meghatározása. A klasszikus Kjeldahl-féle eljárást sokan igyekeztek módosítani, más meghatározási módszert, értékelést kidolgozni [8, 9, 10, 11, 12, 14, 15].

Munkánk során megpróbáltuk a Nessler-reagenssel történő fehérjemeghatározási módszert húsipari termékekre alkalmazni [13]. Célunk az volt, hogy kellő pontosságú, gyorsaságú, gyártásközi és végtermékellenőrzésre egyaránt alkalmazható eljárást dolgozzunk ki. Kísérleteinknél párizsit használtunk fel [16]. Összehasonlító vizsgálatot végeztünk a klasszikus Kjeldahl-módszer és a Nessler-reagenssel történő színekifejlesztésen alapuló, fotometriás kiértékelésű meghatározás között a módszer pontosságát illetően.

Kísérleteink során megpróbáltuk a nagy vegyszer- és időigényes Kjeldahl-módszerből a roncsolás utáni desztillációt kiküszöbölni, és helyette fotometriás kiértékelést alkalmazni. Ezt azért tartottuk szükségesnek, mivel a desztillációs eljárás számos hiba forrása lehet. (Parnass—Wagner-készülék tömítése nem megfelelő, ammóniavesztés léphet fel a desztillálás során, nem észleljük pontosan a végpontot titráláskor, a szükséges oldatok elkészítésekor, faktorozásnál hibát követhetünk el.)

KÍSÉRLETI RÉSZ

1. Kjeldahl-módszer rövid ismertetése

A roncsoláshoz kb. 0,5 g mintát mértünk be analitikai mérlegen, melyhez 0,5 g roncsoló keveréket (K_2SO_4 , $CuSO_4$, Se) és 10 ml cc. H_2SO_4 -at adtunk. Kb. félórás melegítés után, a roncsolás befejeztével 100-as törzsoldatot készítettünk, melynek 20,00 ml-ét desztilláltuk át Parnass—Wagner-készülékben. Az ammóniát 20,00 ml 0,1 n HCl-oldatban kötöttük meg, a maradék sósavat 0,1 n NaOH-dal mértük. Indikátorként metilvörös-metilénkék keverékét használtuk. A nitrogén-, illetve fehérje-

* Kémia Tanszék

tartalmat a következő képlet alapján számoltuk:

$$N\% = \frac{(20,00 \cdot a - b \cdot c) \cdot 0,0014 \cdot 5 \cdot 100}{\text{bemérés}};$$

$a = 0,1$ n HCl faktora,

$b = 0,1$ n NaOH fogyás (ml),

$c = 0,1$ n NaOH faktora.

Fehérjetartalom, % = $N\% \cdot 6,25$.

Eredményeinket az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat

Nitrogén- és fehérjetartalom alakulása Kjeldahl-módszerrel párizsiban

Minta-szám	Nitrogén-tartalom %	Fehérje-tartalom %
1.	3,07	19,19
2.	2,85	17,81
3.	2,47	15,44
4.	2,99	18,69
5.	2,81	17,56
6.	2,34	14,63
7.	2,81	17,56
8.	2,84	17,75
9.	2,75	17,19
10.	2,64	16,50
11.	2,50	15,63
12.	2,48	15,50
13.	2,02	12,63
14.	2,38	14,88
15.	2,67	16,69
16.	2,75	17,19
17.	2,55	15,94
18.	2,71	16,94
19.	2,62	16,38
20.	3,19	19,94

Minta-szám	Nitrogén-tartalom %	Fehérje-tartalom %
21.	3,19	19,94
22.	2,66	16,63
23.	2,78	17,38
24.	2,58	16,13
25.	2,65	16,56
26.	2,62	16,38
27.	2,62	16,38
28.	2,38	14,88
29.	2,47	15,44
30.	2,70	16,88
31.	2,74	17,13
32.	2,55	15,94
33.	2,38	14,88
34.	2,81	17,56
35.	2,39	14,94
36.	2,37	14,81
37.	2,56	16,00
38.	2,53	15,81
39.	2,55	15,94
40.	2,13	13,31

Fehérjetartalom, % átlag: 16,42.

Szórás: 1.52.

2. Nessler-reagenssel kifejlesztett szín fotometriás kiértékelésével történő fehérjetartalom-meghatározás

A módszer elve

A Kjeldahl-féle eljárásnál ismertetett módon roncsolt mintából törzsolatot készítettünk, melynek megfelelő mennyiséghez Nessler-reagenst adtunk. Az anyagban levő nitrogén mennyiségétől függően az oldat sárgától-vörösig elszíneződött. Spekt-

rofotométerrel mérve az extinkciót, a nitrogéntartalom és abból a fehérje, az előzetesen felvett kalibrációs görbe segítségével leolvasható volt.

Az eljárásnál felmerülhető hibaforrásokot megpróbáltuk felderíteni, illetve kiszűrni. E célból vizsgálatokat végeztünk a Nessler-reagens optimális mennyiségének kimérésére, a szín kialakulásának reprodukálhatóságára. A teljes spektrum felvételével kiválasztottuk a mérésre legalkalmasabb hullámhosszt. A továbbiakban vizsgáltuk a kialakuló szín időbeni változását.

A Nessler-reagens készítése

11,00 g HgJ_2 -ot oldottunk 8,25 g KJ jelenlétében kb. 50 ml desztillált vízben; külön feloldottunk 28,80 g NaOH-ot kb. 250 ml desztillált vízben. A teljes oldódás és lehülés után az oldatokat összeöntöttük, és 500 milliliterre egészítettük ki a térfogatot.

A hibaforrások felderítéséhez, illetve a kalibrációs görbe felvételéhez 0,002 mólos ammónium-szulfát törzsoldatot készítettünk.

A Nessler-reagens optimális mennyiségének kimérése

10,00 ml 0,002 mólos ammónium-szulfát-oldatot 10 ml cc. H_2SO_4 -al megsavanyítottuk és 100 milliliterre töltöttük fel. Ennek 1—1 milliliteréhez különböző ismert mennyiségű Nessler-reagenst adagoltunk, és ismét 100 milliliterre hígítottuk.

Mérési adatainkat a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

A mért extinkció értékek alakulása a Nessler-reagens mennyiségének függvényében

Nessler-reagens ml	Hullámhossz értékek (nm)							
	510	500	490	480	470	460	450	440
Mért extinkció értékek								
1,00	—	—	—	—	—	—	—	—
1,50	—	—	—	—	—	—	—	—
2,00	—	—	—	—	—	—	—	—
2,50	—	—	—	—	—	—	—	—
3,00	0,002	0,046	0,103	0,182	0,270	0,378	0,505	0,642
3,50	0,192	0,267	0,362	0,487	0,625	0,790	0,962	1,210
4,00	0,239	0,325	0,413	0,569	0,718	0,900	1,100	1,350
4,50	0,287	0,382	0,490	0,640	0,800	1,000	1,210	1,450
5,00	0,353	0,456	0,579	0,730	0,900	1,100	—	—
5,50	0,363	0,462	0,582	0,745	0,910	1,120	—	—
6,00	0,372	0,467	0,585	0,750	0,920	1,150	—	—
6,50	0,380	0,470	0,590	0,755	0,925	1,160	—	—

Mérési adatainkból az általunk alkalmazott anyagmennyiségekhez 4,00 ml Nessler-reagenst tartottuk megfelelőnek.

Teljes spektrum felvétele 510—400 nm között

A spektrumot 1,00; 3,00; 6,00 ml 10 ml cc. H_2SO_4 -al megsavanyított 0,002 mólus ammónium-szulfát törzsoldattal vettük fel, melyet 100 milliliterre töltöttünk. Ennek 1,00—1,00 milliliteréből 4,00 ml Nessler-reagenssel fejlesztettük ki a színt. Méréseinket a 3. táblázat szemlélteti.

3. táblázat

Teljes spektrum felvétel 510—400 nm között ammónium-szulfát törzsoldatra

Hullámhossz érték (nm)	Ammónium-szulfát törzsoldat (ml)		
	1	3	6
510	0,020	0,160	0,287
500	0,020	0,182	0,327
490	0,025	0,213	0,382
480	0,028	0,248	0,443
470	0,032	0,287	0,510
460	0,039	0,332	0,587
450	0,047	0,382	0,672
440	0,054	0,435	0,767
430	0,067	0,484	0,870
420	0,077	0,565	0,985
410	0,095	0,652	1,120
400	0,125	0,740	1,240

A további vizsgálatok céljára a 420 nm értéket tartottuk megfelelőnek.

A színiakalakulás reprodukálhatósága

1,00; 2,00; 3,00; 5,00 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ törzsoldathoz 10 ml cc. H_2SO_4 -et adtunk 100-as mérőlombikba, majd a lombikot jelre töltöttük. Ebből 1,00—1,00 millilitert kipipettázva 4,00 ml Nessler-reagens hozzáadásával készítettünk 100 milliliteres oldatot. Vizsgálataink során 5—5 párhuzamos mérést végeztünk, adatainkat a 4. és 5. táblázatban foglaltuk össze.

4. táblázat

A kialakuló szín reprodukálhatóságának vizsgálata

Mintaszám	Ammónium-szulfát törzsoldat (ml)			
	1	2	3	5
1.	0,121	0,300	0,435	0,772
2.	0,152	0,295	0,430	0,742
3.	0,162	0,300	0,455	0,750
4.	0,148	0,313	0,440	0,753
5.	0,145	0,318	0,453	0,758

5. táblázat

A 4. táblázat értékeivel a kalibrációs görbéből számított nitrogéntartalmak alakulása

	Ammónium-szulfát törzsoldat (ml)			
	1	2	3	5
	Kalibrációs görbéből számított nitrogén (mg)			
	0,0364	0,1137	0,1635	0,2912
	0,0577	0,1120	0,1614	0,2800
	0,0616	0,1137	0,1719	0,2811
	0,0560	0,1182	0,1652	0,2828
	0,0543	0,1193	0,1708	0,2845
N átlag, mg	0,0532	0,1154	0,1666	0,2839
Szórás	0,0087	0,0029	0,0040	0,0039
Relatív hiba %	7,29	1,12	1,08	0,62

Célszerű minél nagyobb fehérjetartalom bemérésére törekedni, mert ezáltal a szín kialakulásából adódó hiba relatív értékét csökkenteni tudjuk.

A szín csak akkor reprodukálható, ha az alkalmazott NaOH—H₂SO₄ arányt betartjuk.

A szín időbeni változása

A szín változását 1,00; 3,00; 6,00 ml (NH₄)₂SO₄ törzsoldatból a spektrumfelvételnél leírtak alapján kifejlesztett színnel vizsgáltuk.

Méréseinket a 6. táblázatban foglaltuk össze.

6. táblázat

A Nessler-reagenssel kifejlesztett szín időbeni változása 420 nm-nél

(NH ₄) ₂ SO ₄ törzsoldat ml	Idő (perc)				
	10	15	20	25	30
1	0,070	0,077	0,080	0,083	0,085
3	0,560	0,565	0,567	0,568	0,570
6	0,978	0,985	0,990	0,990	0,993

A vizsgálati adatokból azt a következtetést vonhattuk le, hogy 20—25 percig a színállandóság gyakorlatilag biztosított.

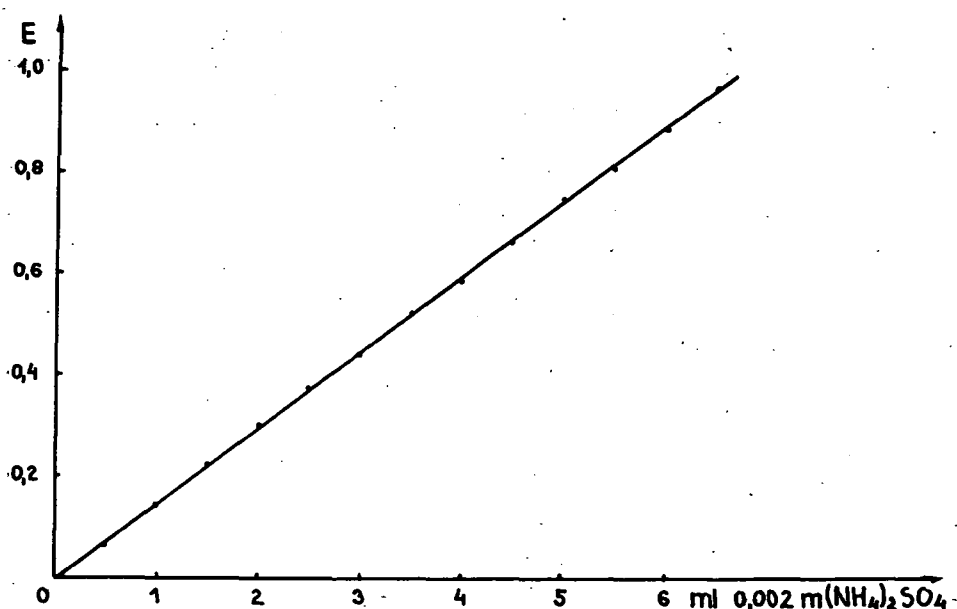
Általános elvi észrevétel

Méréseink során arra a következtetésre jutottunk, hogy a Nessler-reagens nem mutat időbeni állandóságot. Célszerű esetenként újra készíteni, és természetesen az új reagenssel új kalibrációs görbét felvenni.

Az eljárás kivitelezése

A Kjeldahl-módszernél leírtak alapján a roncsolás után elkészített 100-as törzsoldatból 1,00 millilitert pipettáztunk 100-as mérőlombikba, kb. 30 ml desztillált vizet és 4,00 ml Nessler-reagenst adtunk hozzá. A mérőlombikot jelig töltöttük desztillált vízzel, jól összeráztuk. 15 perc szobahőmérsékleten történő várakozási idő után (a direkt napfénytől óvtuk) mértük az oldat extinkcióját 2 cm-es küvettában „Spektromom 360”-al, 420 nm-nél.

Összehasonlító oldatot úgy készítettünk, hogy 0,5 g roncsoló keveréket 10 ml cc. H_2SO_4 -al kb. 20 percig melegítettünk, majd 100-as törzsoldatot készítettünk, melynek 1,00 milliliterét mértük be a vizsgálandó anyag helyett. A kalibrációs görbét $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ törzsoldattal vettük fel, a színt a vizsgálatnál leírtak szerint kifejlesztve. Itt összehasonlító oldatként 4,00 ml Nessler-reagenst 100 milliliterre feltöltve használtunk. A nagyobb koncentrációknál a szín már nem követi a Lambert—Beer törvényt.



1. ábra. Nesslerizációs fehérjetartalom meghatározásához használt kalibrációs görbe (420 nm)

A kalibrációs görbét az 1. ábra, mérési eredményeinket a 7. táblázat mutatja.

Megállapítottuk, hogy a színkifejlesztéses fotometriás kiértékelésű eljárás lényegesen leegyszerűsítette a meghatározást, hiszen a roncsolás után csak egy oldatra, a Nessler-reagensre volt szükség.

A módszer spektrofotométert igényel, azonban az ellenőrző laboratóriumok nagy része már rendelkezik ilyen készülékkel.

A táblázatokból megállapítható, hogy a két eljárás eredményei jó közelítéssel egyeztek ($\pm 0,33\%$).

Ha szem előtt tartjuk, hogy minden húsipari terméknel bizonyos heterogenitással kell számolnunk az összetételt illetően, melyet a 0,5 g-os beméréseknél súlyozot-

tan kell figyelembe venni, a kapott eredmények mindkét eljárásnál külön-külön ki-
elégítőnek tekinthetők. A két módszer közti eltérés nem szignifikáns.

Miután azonos roncsolásból végeztünk méréseket alkalmunk volt szorosabb
összehasonlítást tenni, a mérések kb. 1% relatív pontossággal egyezők a minták
felénél.

Megállapítottuk, hogy a színkifejlesztéses módszer különösen sorozatvizsgá-
tok elvégzésére igen alkalmas, a meghatározási idő lerövidülésével több minta elem-
zését teszi lehetővé.

7. táblázat

Nitrogén- és fehérjetartalom alakulása párizsiban Nessler reagenssel kifejlesztett
szín fotométeres mérései szerint

Minta- szám	Nitrogén- tartalom %	Fehérje- tartalom %
1.	2,94	18,38
2.	2,85	17,81
3.	2,41	15,06
4.	2,91	18,19
5.	2,85	17,81
6.	2,33	14,56
7.	2,85	17,81
8.	2,86	17,88
9.	2,80	17,50
10.	2,63	16,44
11.	2,44	15,25
12.	2,39	14,94
13.	2,06	12,88
14.	2,33	14,56
15.	2,69	16,81
16.	2,75	17,19
17.	2,49	15,56
18.	2,64	16,50
19.	2,52	15,75
20.	3,01	18,81

Minta- szám	Nitrogén- tartalom %	Fehérje- tartalom %
21.	2,91	18,19
22.	2,64	16,50
23.	2,72	17,00
24.	2,60	16,25
25.	2,62	16,38
26.	2,64	16,50
27.	2,61	16,31
28.	2,44	15,25
29.	2,51	15,69
30.	2,68	16,75
31.	2,70	16,88
32.	2,58	16,13
33.	2,35	14,69
34.	2,72	17,00
35.	2,43	15,19
36.	2,35	14,69
37.	2,55	15,94
38.	2,51	15,69
39.	2,44	15,25
40.	2,09	13,06

Fehérjetartalom, % átlag: 16,23

Szórás: 1,88.

IRODALOM

1. Bálint P.: Az élettan tankönyve, Medicina Könyvkiadó, Bp., 1968.
2. Went I.: Élettan, Medicina Könyvkiadó, Bp., 1962.
3. Straub F. Brunó: Biokémia, Medicina Könyvkiadó, Bp., 1961.
4. Bíró E.: A modern biokémia alapkérdései, Gondolat Kiadó, Bp., 1962.
5. T. Kassai St.: A fehérje szerepe a táplálkozásban, Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó, Bp., 1959.
6. Törley D.: Válogatott fejezetek az élelmiszerkémiaiából, Tankönyvkiadó, Bp., 1962.
7. Dévényi T.—Gergely J.: Aminósavak, peptidek, fehérjék, Medicina Könyvkiadó, Bp., 1971.
8. K. Márton P.: Új módszer húskészítmények fehérjetartalmának meghatározására, ÉVIKE 1, 25. (1966).
9. Hendrik A.: Gyors fehérjemeghatározás lehetősége formoltitrálással, Húsipar 4, 164. (1971).

10. dr. Kovács E.-né: Húskészítmények fehérjetartalmának meghatározása lúgos roncsolással, Húsipar 1, 24. (1964).
11. Gärtner K.—Hutterer E.: Pro-Meter, Söripar 12, 5. (1965).
12. Szeverényi E.—Házkötő É.: Gabona- és takarmányfélések fehérjetartalmának vizsgálatáról, ÉVIKE 4, 213. (1966).
13. Mosonyi Á.: Fehérjetartalom-meghatározás a gabonafeldolgozó iparban, Malomipar és Terményporgalom, 1, 15. (1967).
14. Erdey L.: Bevezetés a kémiai analízisbe. Térfogatos analízis, Tankönyvkiadó, Bp., 1962.
15. S. I. Toma—S. Nakai: Ultraviolet spectrophotometric determination of protein in some food products, J. of Food Science, 36, 507. (1971).
16. Parizer gyártástechnológiája, Szegedi Szálamagyár (1972).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ В МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ ФОТОМЕТРОМ С ПОМОЩЬЮ ЦВЕТНОЙ РЕКЦИИ НЕСЛЕРА

Аранка Полак

Для измерения содержания белка в варенной колбасе (парижи) использована комбинация разложения в колбе Кьелдала с последующим фотометрическим анализом цветной реакции Неслера. Исследования показали, что данный метод проще метода определения белков по Кьелдалу (ошибка составляет $\pm 0,33\%$). Метод пригоден для серийных анализов.

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PROTEIN IN MEAT INDUSTRY PRODUCTS USING THE NESSLER REAGENT

Aranka Polák

A method was developed for the determination of the combined protein content of a meat product, long Bologna sausage, by Kjeldahl breakdown and spectrophotometry of the colour developed with the Nessler reagent. It was found that the method is simpler and faster than the Kjeldahl determination, well approaches it in accuracy ($\pm 0,33\%$), and is very suitable for serial examinations.

QUANTITATIVE EIWEISSBESTIMMUNG IN EINEM FLEISCHINDUSTRIE-PRODUKT MITTELS PHOTOMETRISCHER AUSWERTUNG DES MIT NESSLER-REAGENS HERVORGERUFENEN FARBTONES

Von

A. Polák

Die mit der Kjeldahl'schen Methode und der photometrischen Auswertung des mittels Nesslerisation hervorgerufenen Farbtone kombinierte Eiweissbestimmung wurde an einem Produkt der Fleischwarenindustrie (Pariser Wurst) zur Anwendung gebracht. Dabei ergab sich, dass dieses Verfahren einfacher und schneller durchführbar ist als die Bestimmung nach Kjeldahl, sich dieser gut nähert ($\pm 0,33\%$) und auch für Reihenuntersuchungen geeignet ist.